

APPLICANT : LEONE et al.

EXAMINER : STOICA, E.G.

SERIAL NO. : 10/500,665

ART UNIT : 1647

FILED : June 28, 2004

CONFIRM NO.: 3094

FOR

BAG3 NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES TO BE
USED IN THE RESEARCH DIAGNOSTICS AND THERAPY
FOR CELL DEATH INVOLVING DISEASES

DECLARATION UNDER RULE 132 BY PROF. M.C. TURCO





DECLARATION

I declare:

1. I am an inventor of the subject matter that is described and claimed in the above captioned patent Application.
2. My colleagues and I have carried out experiments which confirm the diagnostic applications of the anti-BAG-3 monoclonal antibodies, corresponding to the mAb AC-1 (Deposit n° PD02009) described in the patent Application US 10/500,665.
3. The expression of BAG-3 was investigated in primary tumors by immunohistochemistry. Positivity was scored as follows:

0 = negative to mAb
1 = 10% of positive cells
2 = 10-50% of positive cells
3 = >50% of positive cells

The following human tumors were studied:

- *Lung tumors*
 - Normal lung tissue: negative.
 - 13 epidermoid carcinomas:
 - 0 = none
 - 1 = 2 cases
 - 2 = 5 cases
 - 3 = 6 cases
 - 13 adenoid carcinomas:
 - 0 = 1 case
 - 1 = 3 cases
 - 2 = 7 cases
 - 3 = 2 cases
 - 4 large cell carcinomas:
 - 0 = none
 - 1 = 1 case

2 = 1 case

3 = 2 cases

- 2 carcinoid tumors:

0 = 1 case

3 = 1 case

- 3 endocrine carcinomas:

0 = none

1 = 1 case

2 = 2 cases

3 = none

- 31 small cell carcinomas:

0 = 13 cases

1 = 9 cases

2 = 6 cases

3 = 3 cases

• *Breast tumors*

- Normal breast tissue: negative.

- 10 displasias:

0 = 5 cases

1 = 2 cases

2 = 3 cases

3 = 0 cases

- 9 fibroadenomas :

0 = 0 case

1 = 1 case

2 = 5 cases

3 = 3 cases

- 27 carcinomas:

0 = 4 cases

1 = 10 cases

2 = 5 cases

3 = 8 cases

- *Prostate carcinomas*

We analyzed:

24 cases: 22 were clearly positive for nuclear expression, that was not detected in the surrounding normal tissue. (Stained tissue section enclosed photo: enclosure A).

- *Ovarian cancers*

Preliminary results show BAG3 positivity only in malignant tumors.

Furthermore I declare that:

4. The antibody mAb AC-1 (Deposit n° PD02009) has been used in my lab on thyroid specimens in immunohistochemistry.

The analysis showed that in normal tissue and benign lesions (tot. 30 cases: goiter and adenomas) the mean value positivity scored 0.37 ± 0.085 , while in malignant lesions (tot 56 cases: follicular, papillary and anaplastic carcinoma), the mean value positivity scored 2.31 ± 0.15 .

Score assignment was as follows: from 0 to 4 (score=0, no positive cells; score=1+, <10% of positive cells; score=2+, 11–50% of positive cells; score=3+, 51–75% of positive cells; score=4+, 75–100% of positive cells). These findings indicate that BAG3 is expressed in thyroid carcinomas but not in normal thyroid cells. As shown in Encl. B, panel C, increasing BAG-3 expression is observed from goiter (a), to papillary (b), follicular (c), and anaplastic (d) carcinoma.

I further declare that this expression pattern differed from that displayed by BAG1 protein; in fact, in addition to neoplastic cells, goiter and adenoma cells were positive for BAG1 in immunohistochemistry analysis (results not shown).

According to the above results, BAG3 expression appears to characterize the malignant state and mAb AC-1 represents a very useful tool for its detection, diagnostic purposes and prognostic evaluation.

5. All statements made herein of my knowledge are true and all statements made on information and belief are believed to be true; and further these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patents issued thereon.

Date: September 8th, 2008

Signature:  ☐

Printed name: MARIA CATERINA TURES

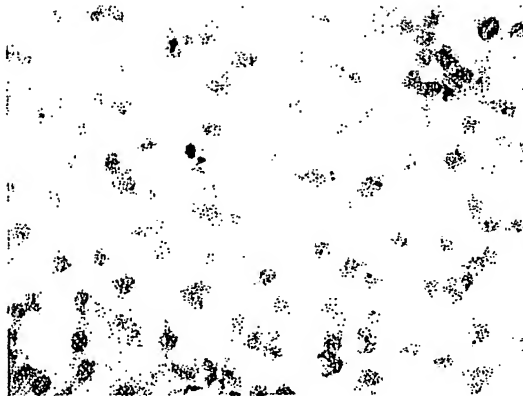
A: immunohistochemistry of a prostatic tumor with the anti-BAG-3 antibody (from AC-1 hybridoma).



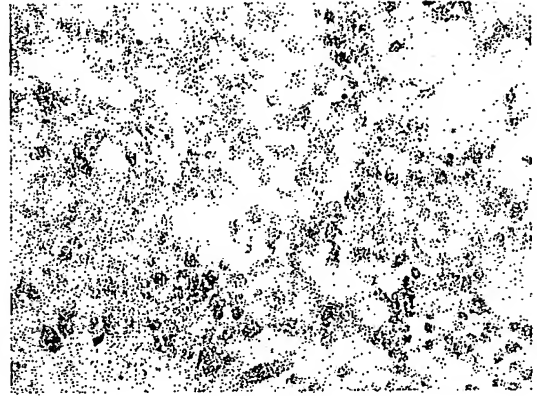
End. A

A

a



b



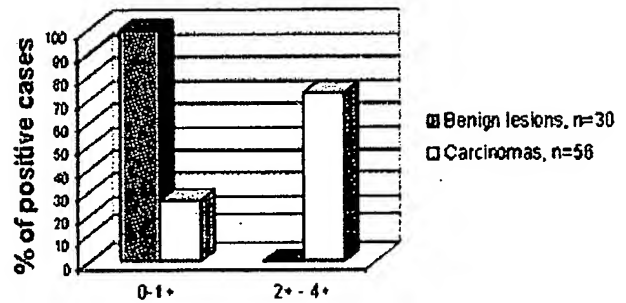
B

Histologic type of thyroid lesions	Percent of thyroxine positive cells				
	0	1+	2+	3+	4+
Normal thyroid tissue	5				
Nodular goiter (n=11)	18	1			
Follicular adenomas (n=11)	2	8			
Follicular carcinomas (n=11)	1	5	8	1	0
Papillary carcinomas (n=21)	1	7	4	11	
Anaplastic carcinomas (n=11)	0	1	0	2	10

The percentage of thyroid cells positively stained was scored from 0 to 4: 0% positive cells, 1+ = 1-10% of positive cells, 2+ = 11-50% of positive cells, 3+ = 51-75% of positive cells, and 4+ = 76-100% of positive cells; n = number of analyzed cases.

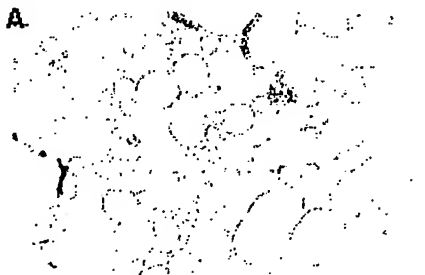
Type of thyroid tissue	Mean value of positivity + ES (n° of cases)
Normal tissue and benign lesions (goiters, adenomas)	$0.37 \pm 0.085 (30)^*$
Malignant lesions (follicular, papillary and anaplastic carcinomas)	$2.31 \pm 0.15 (56)^*$

*p<0.01

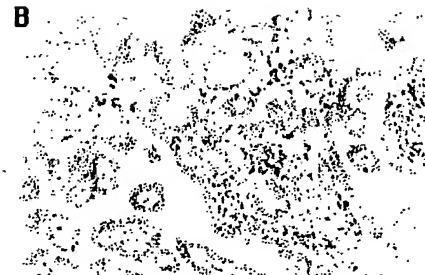


C

A



B



C



D



End. B

Trattato di Budapest sul Riconoscimento Internazionale del Deposito di Microorganismi per
motivi di Brevetto

Formulario Internazionale



Prof. Arturo Leone
Via Domenico Fontana, 134/4
80128 Napoli

Prof. Maria Caterina Turco
Via Errico, 37
83100 Avellino

Ricevuta di deposito originale
emessa ai sensi della Regola 7.1
dalla Autorità Internazionale di Deposito
sotto specificata

I. Identificazione del microorganismo (ibridoma o linea cellulare)

Riferimento identificativo fornito dal
Depositante:
15F6/1

Numero di accesso assegnato dall'Autorità
Internazionale di Deposito: PD02009

II. Descrizione scientifica e/o designazione tassonomica proposta

L'ibridoma identificato al punto I era accompagnato da:



una descrizione scientifica



una designazione tassonomica
proposta

III. Ricevuta e accettazione

Questa Autorità Internazionale di Deposito accetta l'ibridoma identificato al punto I, ricevuto
il giorno 17 Dicembre 2002 (data del deposito originale)

IV. Ricevuta di richiesta di conversione

L'ibridoma identificato al punto I è stato ricevuto da questa Autorità Internazionale di
Deposito il giorno (data del deposito originale)

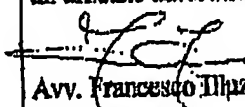
una richiesta di convertire il deposito originale in deposito ai sensi del trattato di Budapest è
stata ricevuta il giorno (data della richiesta di conversione)

V. Autorità Internazionale di Deposito

Nome:
Centro di Biotecnologie Avanzate (CBA)
Interlab Cell Line Collection

Indirizzo:
L.go R. Benzi, 10
16132 GENOVA ITALIA

Firma del Rappresentante Legale
dell'Autorità Internazionale di Deposito o di
un ufficiale autorizzato:


Avv. Francesco Ilpizzi
Presidente CBA

**Trattato di Budapest sul Riconoscimento Internazionale del Deposito di Microorganismi per
motivi di Brevetto**

Formulario Internazionale

Prof. Arturo Leone Via Domenico Fontana, 134/4 80128 Napoli Prof. Maria Caterina Turco Via Errico, 37 83100 Avellino	Dichiarazione di vitalità emessa ai sensi della Regola 10.2 dalla Autorità Internazionale di Deposito sotto specificata
---	--

I. Depositante	II. Identificazione del microorganismo (ibridoma o linea cellulare)
Prof. Arturo Leone Via Domenico Fontana, 134/4 80128 Napoli Prof. Maria Caterina Turco Via Errico, 37 83100 Avellino	Numero di accesso assegnato dall'Autorità Internazionale di Deposito: PD 02009 Data del deposito o del trasferimento: 17 Dicembre 2002

III. Dichiarazione di vitalità

La vitalità del microorganismo identificato al punto II è stata controllata
 il giorno **20 Dicembre 2002**. A quella data, il suocitato microorganismo è risultato

☒ **vitale**

☐ **non vitale**

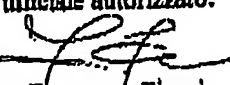
IV. Condizioni di effettuazione del test¹

V. Autorità Internazionale di Deposito

Nome:
 Centro di Biotecnologie Avanzate (CBA)
 Interlab Cell Line Collection

Indirizzo:
 L.go R. Benzi, 10
 16132 GENOVA ITALIA

**Firma del Rappresentante Legale
 dell'Autorità Internazionale di Deposito o di
 un ufficiale autorizzato:**


 Avv. Francesco Iluzzi
 Presidente CBA

¹ Compilare solo se l'informazione è stata richiesta e se il risultato del test era negativo